

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ
МЕТОДОВ ВВЕДЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ
VACCINIUM CORYMBOSUM L. IN VITRO**

Е.П. Глеб, Е.С. Гук, 4 курс

Научные руководители – О.А. Кудряшова, н.с.,

А.А. Вологович, к.б.н.

Полесский государственный университет

Процесс клонального микроразмножения растений *in vitro* начинается с этапа введения растений в культуру *in vitro* путем стерилизации первичных эксплантов с последующим их размещением на стерильной, питательной среде для инициации побегообразования [1].

Целью настоящей работы является сравнительный анализ эффективности стандартных и модифицированных методов введения и стабилизации сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. в культуре *in vitro*.

Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО “Полесский государственный университет” в 2009–2011 гг.

В качестве объекта исследований использовали 20 сортов голубики высокой *V. corymbosum* L.: Блюджей, Торо, Блюголд, Нельсон, Дарроу, Чандлер, Патриот, Нортланд, Блюкроп, Эрлиблю, Джерси, Легаси, Герберт, Конкорд, Стенли, Цукертраубе, Река, Элизабет, Денисблю, Дюк.

В качестве первичных эксплантов для стерилизации и введения в культуру *in vitro* использовали неодревесневшие, верхушечные фрагменты стебля длиной 15 мм с 1–2 почками. Общее количество эксплантов всех исследуемых сортов составило более 3000 единиц.

В качестве стерилизующего агента по модифицированной методике введения растений всех исследуемых сортов *V. corymbosum* L. в культуру *in vitro* использовали 7,5% раствор гипохлорита натрия, при продолжительности экспозиции эксплантов 25 минут. После стерилизации и отмывки в стерильной дистиллированной воде экспланты сортов Блюджей, Торо, Блюголд, Нельсон, Дарроу, Чандлер, Патриот, Нортланд, Блюкроп, Эрлиблю, Джерси, Легасия, Герберт, Конкорд, Стенли высаживали в пробирки диаметром 22 мм, на питательные агаризованные среды с органическими соединениями, в частности, 15 мг/л 6- γ , γ -диметилаллиламино-пурин (2iP), 4 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и на макро-, микро- солевой основе WPM [1, 2].

Экспланты сорта Нортланд высаживали в пробирки с основой WPM, различающиеся по содержанию/концентрации 24-эпибрассинолида (ЭБ): 0,00 мг/л ЭБ – контроль; 0,50 мг/л ЭБ. Экспланты сортов Нортланд, Блюкроп, Патриот высаживали в пробирки на 3 типа сред различающихся по содержанию/концентрации 24-эпибрассинолида (0,00 мг/л ЭБ – контроль; 0,25 мг/л ЭБ; 0,50 мг/л ЭБ; 0,75 мг/л ЭБ). Экспланты сорта Цукертраубе высаживали в пробирки на 4 типа сред: тип 1 – макро-, микро-солевая основа WPM с 15 мг/л 2iP и 0,75 мг/л ЭБ; тип 2 – макро-, микро-солевая основа WPM с 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л ЭБ; тип 3 – макро-, микро-солевая основа Андерсона с 15 мг/л 2iP и 0,75 мг/л ЭБ; тип 4 – макро-, микро-солевая основа Андерсона с 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л ЭБ.

Экспланты сортов Река, Элизабет, Денисблю высаживали в пробирки на основе WPM с 15 мг/л 2iP, и на основе Андерсона с 1 мг/л зеатина, содержащие дополнительно 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида. Модификация среды Андерсона также заключалась в повышении концентрации сульфата меди в 10 раз – 0,25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и хлорида кобальта в 2 раза – 0,05 мг/л $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Экспланты сортов Дюк, Нельсон, Блюголд, Эрлиблю высаживали на среду на основе Андерсона с 1 мг/л зеатина, с повышением содержания сульфата меди – 0,25 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и хлорида кобальта – 0,05 мг/л $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, дополненную 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида.

Учет общего количества стерильных эксплантов, и стерильных регенерирующих эксплантов проводили каждые 7 дней культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, освещенности 4000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [3], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [4].

Результаты первых введений сортовой голубики высокой по стандартным методам [1] представлены в таблице 1. Следует отметить часто низкий выход стерильных эксплантов в пределах 3–73%, а также в подавляющем большинстве случаев исключительно низкий выход активно регенерирующих, стерильных эксплантов (0–25%).

Таблица 1 – Выход стерильных эксплантов на питательной, агаризованной среде с органическими соединениями и на макро-, макро-солевой основе WPM, 2009–2010гг.

Сорт	Общее количество эксплантов	Количество стерильных эксплантов <i>in vitro</i> %	Количество активно регенерирующих эксплантов, пригодных для пассажа, %
Блюджей	146	33,56	25,34
Торо	34	2,94	0,00
Блюголд	80	18,75	5,00
Нельсон	160	28,75	6,88
Дарроу	319	28,21	3,76
Чандлер	45	15,56	2,22
Патриот	70	8,57	8,57
Нортланд	81	39,50	8,64
Блюкроп	265	57,73	9,06
Эрлиблю	79	58,23	5,06
Джерси	266	46,24	4,89
Легаси	30	73,00	13,00
Герберт	76	67,10	0,00
Конкорд	286	60,49	12,94
Стенли	100	72,00	5,00

Результаты введения и стабилизации сортовой голубики высокой на модифицированных нами по составу питательных, агаризованных средах приведены в таблицах 2, 3. Следует отметить значительное увеличение выхода как стерильных эксплантов (25–100%), так и активно регенерирующих, стерильных эксплантов (6–73%).

Таблица 2 – Выход стерильных, активно регенерирующих *in vitro* эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных по составу питательных средах, 2010–2011 гг.

Сорт	Вариант опыта	Общее количество ПЭ, шт.	Количество стерильных ПЭ, %	Количество активно регенерирующих стерильных ПЭ, %
Патриот	1 (контроль)	161	58,0±16,0	13,5±4,5
	2 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	132	74,7±18,2	25,8±0,1
Нортланд	1 (контроль)	48	68,0	17,0
	2 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	28	100,0	82,0
Блюкроп (от 23.09.10)	1 (контроль)	88	37,7	22,4
	2 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	91	64,8	26,2
Блюкроп (от 14.10.10)	1 (контроль)	57	33,4	15,7
	2 (0,25 мг/л 24–ЭБ)	43	25,0	16,3
	3 (0,50 мг/л 24–ЭБ)	44	25,6	20,5
	4 (0,75 мг/л 24–ЭБ)	58	46,6	34,5

Примечание – ПЭ – первичные экспланты. Данные для сорта Патриот представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка.

Таблица 3 – Выход стерильных, активно регенерирующих *in vitro* эксплантов сортовой голубики высокой на модифицированных по составу питательных средах, 2011 гг.

Сорт	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %		Сорт Цукер траубе	WPM		Андерсона	
	WPM _{ЭБ_0,75}	Андерсона _{ЭБ_0,75}		2iP ₁₅ ЭБ _{0,75}	Зеатин ₁ ЭБ _{0,75}	2iP ₁₅ ЭБ _{0,75}	Зеатин ₁ ЭБ _{0,75}
Река	33,30	71,45	Количество стерильных эксплантов, %	76,90	77,30	64,70	70,96
Элизабет	9,09	54,54					
Денисблю	62,50	72,73					
	40,00	61,54	Количество стерильных, активно регенерирующих эксплантов, %	7,65	6,87	5,80	25,80
Дюк	–	71,43					
Нельсон	–	41,66					
Блюголд	–	65,52					
Эрлиблю	–	50,00					

По результатам исследований в Национальном центре интеллектуальной собственности были зарегистрированы 2 заявки № А20110076 от 20.01.2011 г. и № А20111446 от 31.10.2011г. о выдаче патентов на изобретения.

Список использованных источников

1. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Мн., 1996. – 246 с.
2. Trigiano, R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
3. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
4. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб: Питер, 2001. – 688 с.